Aus dem Institut für Angewandte Zoologie der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. K. Gößwald

Untersuchungen zum Problem der künstlichen Begattung der Bienenkönigin (Apis mellifica L.)

Auszug
aus der
I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N
zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

vorgelegt von
Ferdinand Köhler
Würzburg 1955

Eingereicht am: 10. Mai 1955
Tag der mündlichen Prüfung: 20. Juni 1955

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meinem verehrten Lehrer schulde ich besonderen Dank für viele Anregungen, großzügige Förderung und fachlichen Rat.

Herrn Pfarrer Herold Danke ich für seine wertvolle Unterstützung.

Aus dem Inhalt:

Biologie der natürlichen Begattung.- Belegstellen.- Die künstliche Besamung nach Mackensen und Roberts mit mehreren Drohnen.- Die kontrollierte Begattungsmethode mit einer Drohne.- Material und Methode.- Die Überwachung der kontrolliert begatteten Königinnen.- Untersuchungsergebnisse der kontrolliert begatteten Königinnen.- Vergleich mit natürlich begatteten Königinnen.- Samen und Samenvorrat von Hornissen.- Künstliche Paarungsversuche von Lorkovic bei Schmetterlingen.- Untersuchung von Drohnen der Honigbiene unter besonderer Berücksichtigung der Ejakulate hinsichtlich der natürlichen und künstlichen Begattung.- Quantitative Untersuchungen des Ejakulates der neun möglichen Drohnentypen und der im freien Flug befindlichen Drohnen.- Qualitative Untersuchungen des Ejakulates.- Morphologie.- Typische und atypische Lebensäußerungen des Spermas.- Anabiose mit Vitalitäts- und Lebensdauertesten.- Papierchromatographische Untersuchungen des Ejakulates.- Fehlstülpungserscheinungen und deren Erscheinungsformen.- Diskussion der Ergebnisse.- Zusammenfassung.- Literaturnachweis.

Die Kopulation von Drohne und Königin der Honigbiene vollzieht sich im Freien während des Fluges in der Luft. Die Versuche, zwecks planmäßiger Kreuzung für genetische Untersuchungen die Begattung innerhalb großer Zelte (Goetze 1925) und in hohen Gewächshäusern (Böttcher u. Mertens 1937) zu erzwingen, sind mißlungen. Ebenso ist damit auch eine Zuchtauswahl nach wirtschaftlichen Erwägungen kaum durchführbar. Der Wert der Belegstellen ist durch jüngste Untersuchungsergebnisse sehr in Frage gestellt, die zusammengefaßt folgendes aussagen: 1. Der Flugradius der Drohnen ist weiter als bisher angenommen wurde (Livenetz 1951). 2. Die Drohnen sind nur in geringem Prozentsatz stocktreu und vermischen sich mit den Völkern der Umgebung (eigene unveröffentlichte Untersuchungen). 3. Durch Mehrfachbegattung (Ruttner 1953) kann der Samenvorrat einer Königin von mehreren Drohnen stammen. Die natürliche Kopula scheidet somit für genetische Zuchtwahl aus.

Die vielfältigsten Möglichkeiten wurden bereits erprobt, um zu solchen Zuchtmöglichkeiten zu gelangen wie bei den meisten anderen domestizierten Tieren.

Nachdem Laidlaw (1944) die Funktion der "Valvefold" oder Ventilfalte in der Vagina der Bienenkönigin entdeckt hatte, die die bisherigen Methoden der künstlichen Besamung behinderte, gelang

Mackensen und Roberts (1948) die erste erfolgreiche Samenübertragung. Nach ihrer Methode wird die Bienenkönigin unter CO_2-Narkose in einer Art von Manipulator eingespannt, die Vagina mit zwei Spezialhäkchen geöffnet, mit einer feinen Spritze von dem gestülpten Penis der Drohne das Sperma abpipettiert und schließlich in die Vagina übertragen, während ein drittes Häkchen die Ventilfalte niederdrückt. Da die Spritze nicht den gesamten Samenvorrat einer Drohne mit einer Füllung erfassen kann (durchschnittlich nur 0,87 Millionen Spermien je Spritze), ist es notwendig, eine Königin viermal künstlich zu besamen. Für die viermalige Besamung ist das Ejakulat von 8 Drohnen notwendig. Mackensen und Roberts haben in zahlreichen Fällen die Samenmenge im Receptaculum seminis von künstlich besamten sowie auch von normal begatteten Königinnen gemessen und verglichen.

Tabelle I

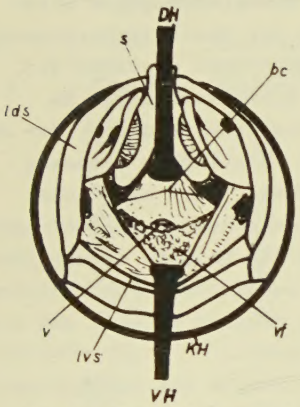
(nach Mackensen und Roberts)

Behandlungsart	Zahl der Königinnen	Zahl der Spermien im Rec. sem. (in Millionen) Durchschnitt	Grenze
Künstliche Besamung: Samen von 1 Drohne	17	0,87	0,22-2,24
Samen von mehreren Drohnen (2,5 mm^3)			
einmal kstl. besamt	11	2,97	1,18-4,41
zweimal " "	9	4,11	2,05-5,65
dreimal " "	10	4,85	3,71-3,80
viermal " "	11	5,52	4,66-6,97
natürlich begattete Königinnen:	33	5,73	3,34-7,35

Nach Mackensen und Roberts haben natürlich begattete Königinnen durchschnittlich 5,73 Millionen Spermien als Samenvorrat im Receptaculum seminis. Diese Anzahl wird, wie schon erwähnt, nur mit einer viermaligen Einspritzung erreicht, wobei je Spritze 2,97 Millionen Spermien im Durchschnitt übertragen werden. Durch die mehrfache Besamung mit mehreren Drohnen ist zwar ein genügender Samenvorrat erreicht, jedoch ist bei Verwendung von 8 Drohnen keine einheitliche genetische Grundlage für eine Zucht vorhanden.

Zugunsten klarer genetischer Verhältnisse sollte eine Methode entwickelt werden, die eine Begat-

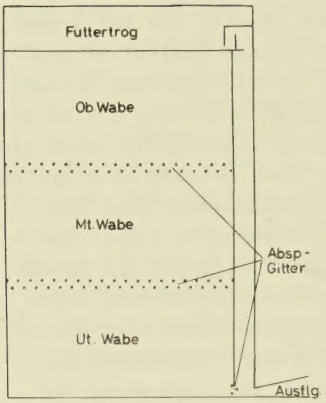
t u n g m i t n u r e i n e r D r o h n e e r l a u b t .



Aus dem Glashalter ragende Abdomen der Bienenkönigin. Dorsal-und Vetralhaken sind eingespannt.KH=Königinhalter;v=Vagina;vf=Ventilfalte;bc=Bursa copulatrix;

Die natürliche Kopula, die auf einem Verhängen der beiden Genitalien beruht, ist in der erarbeiteten Methode das Grundprinzip. Die Königin wird wie bei Mackensen in einem Manipulator eingespannt. Mit zwei Häkchen wird die Abdomenspitze (Stachelraum) nach der Dorsal- und Ventralseite soweit geöffnet, bis die Vagina mit der davorliegenden Ventilfalte sichtbar wird. Wie bei der Spritzmethode wird die Königin unter einer CO_2-Narkose gehalten. Die nach den Erwägungen des zweiten Abschnittes dieser Arbeit ausgesuchte Drohne wird nun mit dem Abdomenende in den gespreizten Stachelraum der Königin gehalten und durch einen leichten Druck zur Stülpung des Penis in den Geschlechtsapparat der Königin veranlaßt. Ist nun die Verquickung beider Organe so vollkommen, daß beim vorsichtigen Wegziehen der Drohne der Penis in der Geschlechtsöffnung der Königin stecken bleibt und von der Drohne leicht abreißt, so ist mit einer erfolgreichen Begattung zu rechnen. Ist es dagegen möglich, den Penis gleichzeitig mit dem Wegziehen der Drohne wieder aus dem Geschlechtsorgan der Königin zu entfernen, so ist keine Begattung erfolgt. Ist dies der Fall, so kann der Vorgang des öfteren wiederholt werden, bis beide Geschlechtsorgane abreißbar verhängt sind.

Um die Königinnen nach der Besamung noch unter Kontrolle zu halten und sie vor allem an einem eventuellen nachträglichen Hochzeitsflug zu hindern, wurden Glasbeobachtungsbeuten konstruiert, die aus 2 oder 3 übereinander angeordneten Zanderwaben bestehen. Die einzelnen Wabenräume können jeweils mit einem doppelten Absperrgitter getrennt werden, durch die zwar die Arbeiterinnen, aber nicht die Königinnen hindurchschlüpfen können. In das unterste Wabenrevier mündet der ebenfalls mit Doppel-Absperrgitter versehene Ausflugschacht. Die doppelten Absperrgitter wurden verwendet, um die Berührung von



Schema der Glasbeobachtungsbeute mit doppelten Absperrgittern.

Königinnen zu vermeiden. Durch das Verhalten der Königinnen gegen Rivalinnen und bei der Revierverteidigung ist es zusätzlich noch möglich, die Königinnen an einem Ausfliegen zu hindern. Ein Begattungsausflug, der die Ergebnisse der künstlichen Besamung verfälschen könnte, wird mit dieser Anordnung weitestgehend ausgeschlossen.

Die nach der Methode dieser Arbeit "kontrolliert begatteten" Jungköniginnen wurden in drei Gruppen geteilt und entsprechend behandelt.

Gruppe 1: Begattungen mit rassenfremden Drohnen. Die Königinnen wurden bis zu ihrem natürlichen Tode am Leben erhalten, um die Legeleistung, das Verhalten und genetische Fragen der rassisch dominierenden Merkmale zu prüfen.

Gruppe 2: Inzucht, Bruder-Schwester-Kreuzung. Sonst wie Gruppe 1, nur mit dem Ziel, reine Rassen zu erhalten und den bei Inzucht auftretenden Letalfaktor zu studieren. Durch die geringe Zahl von höchstens 2 Generationen im Jahr ist die Auswertung der Gruppe 1 und 2 noch nicht abgeschlossen.

Gruppe 3: Begattung mit besonders ausgesuchten Drohnen. Diese Königinnengruppe wurde ausschließlich für anatomisch-histologische Untersuchungen verwendet. Den Befund der 3. Gruppe gibt die Tabelle II wieder. Die Spermien wurden nach der Methode von Roberts in der Blutzählkammer ausgezählt. Um möglichst viele Stadien der kontrolliert begatteten Königinnen zu erfassen, wurden Königinnen vom 16. bis zum 392. Tage nach dem Schlüpfen, beziehungsweise vom 8. bis zum 382. Tage nach der kontrollierten Begattung untersucht.

Tabelle II

Die kontrolliert begatteten Jungköniginnen

Opal. Nr. der ♀	Lebens-dauer i.Tagen	Begattung nach dem Schlüpfen	Recept.sem. Spermien in Mill.	Anzahl der abgelegten Eier (± 2 %) ♀	♂
1	210	8	3,98	24000	-
2	392	10	4,57	25000	-
4	210	7	1,24	1000	62
5	16	8	5,54	-	-
6	68	15	6,32	38	-
8	97	12	4,81	-	151
9	42	20	4,89	29	-
10	60	30	-	-	61
11	42	5	-	-	39
12	60	10	2,11	19	-
Unbegattete ♀♀					
3	128	-	-	-	21
7	163	-	-	-	110

Alle Königinnen kamen nach der kontrollierten Begattung gleich in die Glasbeobachtungsbeute, um ein nachträgliches Ausfliegen zu verhindern. Die beiden unbegatteten Königinnen 3 und 7 wurden als "Wächterinnen" auf die unterste Wabe gesetzt und gleichzeitig als Gegenkontrolle für die Versuche bewertet. Das Recept. sem. der Königinnen 10 und 11 wies keinerlei Füllung auf, somit waren die Tiere fehlbegattet. Die Königin 8 war nach der Legeleistung (drohnenbrütig) scheinbar fehlbegattet, erst die Untersuchung der Samenblase zeigte die Füllung mit agglutinierten Spermien. Der durchschnittliche Samenvorrat der kontr. begatteten Königinnen ist zwar niedriger als der Durchschnitt der viermal künstlich besamten Königinnen, jedoch trotz Verwendung nur einer Drohne bedeutend höher als eine Spritze von einem Ejakulat erfassen kann.

Um vergleichsweise festzustellen, welche Samenmengen für die natürliche Kopulation vorhanden sind, wurden im Sommer 1954 die Ejakulate der freifliegenden Drohnen nach dem Blutzählkammerverfahren quantitativ untersucht. Der Mittelwert beträgt 4,76 Millionen Spermien in einem Ejakulat. Für einen hinreichenden Samenvorrat der Königin ist die 3-Millionengrenze von besonderer Bedeutung. Von den 264 Drohnen hatten 82,5 % soviel Samenvorrat, um eine ausreichende Füllung des Receptaculum seminis zu gewähren. Diese 3-Millionen-Spermiengrenze äußerte sich auch im Verhalten von 8 besonders in dieser Hinsicht untersuchten normalbegatteten Königinnen.

Die 8 Weisel wurden nach einem Begattungsausflug an jeglichem weiteren Ausfliegen gehindert. Es sollte unter anderem die Samenmenge festgestellt werden, die durch einen einmaligen natürlichen Begattungsausflug übertragen wird. Der durchschnittliche Samenvorrat dieser 8 Königinnen war 4,175 Millionen Spermien, was mit den Roberts'schen Untersuchungen von natürlich begatteten Königinnen um 1,56 Millionen nach unten differiert. Drei der untersuchten 8 Königinnen zeigten gegen die anderen fünf ein auffallend unruhiges Verhalten, das bis zu 20 Tagen nach dem Begattungsausflug anhielt. Diese 3 Weisel hatten, wie die spätere Auszählung des Receptaculum zeigte, unter 3 Millionen Spermien als Samenvorrat (M = 1,37 Mill. gegen M = 5,406 Mill. der übrigen 5 Königinnen).

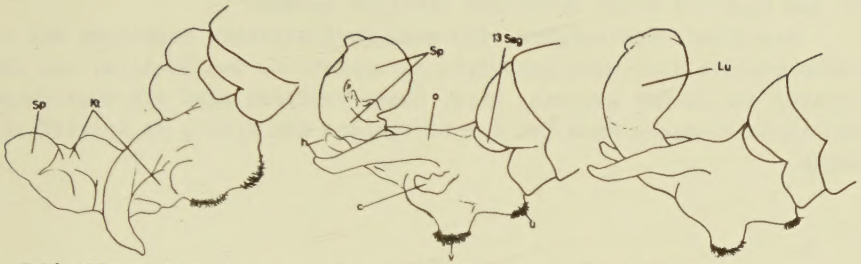
Tabelle III

Anzahl der Spermien im Ejakulat in Millionen (Klassengröße 0,99 Millionen)	Anzahl der Drohnen
0,0 bis 0,99	2
1,0 " 1,99	16
2,0 " 2,99	28
3,0 " 3,99	43
4,0 " 4,99	50
5,0 " 5,99	53
6,0 " 6,99	48
7,0 " 7,99	21
8,0 " 8,99	3
Summe	264

Während der quantitativen Ejakulatsuntersuchungen kamen bei den Drohnen Fehlstülpungsformen des Penis vor, die auch bei der natürlichen Kopula zu Fehlbegattungen führen dürften. Die Apis-Drohne vermag im Normalfall das Geschlechtsorgan in zwei Phasen zu stülpen: 1. Phase. Umstülpen der paarigen Seitenhörner, des viereckigen Haarfeldes und des eigentlichen Penis (dieser nur geringfügig); 2. Phase. Der Penis wird vollständig ausgestülpt, das viereckige Haarfeld und die Seitenhörner werden ventral- und distalwärts verschoben. Die Samenmasse tritt in der letzten Phase am Penisende als hellgrauer Tropfen in Erscheinung.

Es wurden verschiedene Formen von Fehlstülpungen beobachtet: Luft- oder kotgefüllter Penis, Luftblase im oder vor dem Ejakulat im proximalen Teil des Penis und unvollständige Stülpung. Von 264 im freien Flug befindlichen Drohnen hatten 17 % fehlgestülpt.

Um die Ursachen des ungenügenden Samenvorrates und der Fehlstülpungen zu untersuchen, wurden Drohnen unter bestimmten experimentellen Bedingungen aufgezogen. Dabei konnte festgestellt werden, daß die Eilieferantin (begattete Königin, unbegattete Königin oder fertile Arbeiterin) keinen Einfluß auf die Spermamenge hat. Dagegen ergab die Aufzucht in Arbeiterinnen-, Drohnenzelle und Weiselwiege Tiere mit quantitativ unterschiedlichen Ejakulaten. Die Drohnen, die aus Weiselwiegen (Gw-Type) stammten, hatten die meisten Spermien im Ejakulat (M = 7,6 Mill. Sp.), dagegen die Drohnen, die aus Arbeiterinnenzellen stammten



Fehlstülpungsform mit Kotvermischtem Inhalt | **Normal gestülpter Drohnenpenis** | **Fehlstülpungform mit Luftblase**

c=Chitinspange des Zwiebelstückes;h=paarige Seitenhörner;o=oberer Höcker; u=Unterhöcker;v=viereckiges Haarfeld;Sp=Samenpfropfen;Lu=Luftblase;Kt=Kot;

Die Zeichnungen stellen Schemata dar.

(ea-Type), die wenigsten (M 2,12).

Umgekehrt proportional der Quantität war die Qualität der Ejakulate der Gw und ea. ("Qualitativ" wird hier im physiologischen Sinne angewandt und nicht im genetischen). Neben normalem Verhalten der Spermien im Ejakulat und in Verdünnern wurde auch anormales Verhalten festgestellt. Als typisch sind gleichmäßige, spiralen- oder wellenförmige Bewegungen zu bezeichnen. Als anormal wurden komma-, kreisförmige Bewegungen, sowie kopflose, doppelköpfige, doppelgeißelige und quellköpfige Spermien festgestellt. Experimentell konnten durch Veränderung des p_H, des Redoxpotentials, durch den Zusatz von Oberflächenentspannern und verschiedener Chemikalien Quellung und Schrumpfung der Köpfe, Agglutination des Ejakulates und noch andere Effekte erzielt werden. Die papierchromatographische Analyse ergab die doppelte Anzahl von freien Aminosäuren im Bienenejakulat gegenüber solchen von Rindern (Bos taurus L.). In annähernd gleicher Häufigkeit sind in beiden Ejakulaten Glutaminsäure und Lysin enthalten, wogegen Prolin, Histidin und Tyrosin nur dem Bienen- und Hornissen-Ejakulat eigen sind.

Um dem Problem der Anabiose näher zu kommen und um Qualitäts-Teste durchführen zu können, war es notwendig, Spermien unter experimentellen Bedingungen am Leben zu erhalten. Hierzu waren Versuchsreihen erforderlich mit physiologischen Nährlösungen. Mit einem Verdünner, bestehend aus: 50 ccm Aqua bidest., 1,5 g Natriumcitrat, 2,5 g Traubenzucker, 0,25 g Gelatine, 1000 Einheiten Penicillin, 0,15 g Sulfanilamid konnte bei einer Temperatur von + 5° C eine Lebenszeit von 624 Stunden ($\pm$ 2 %)

mit dem Ejakulat einer ea-Drohne erreicht werden.

Die Arbeit hat ergeben, daß eine kontrollierte Begattung mit einer Drohne möglich ist, wenn besonders auf Quantität und Qualität des Samenvorrates der Drohne geachtet wird. Damit eröffnet sich die Möglichkeit, genetische Probleme auch bei der Honigbiene mit Erfolg in Angriff zu nehmen.

Literaturauszug

Albert,M., Jordan,R.,F.u. H.Ruttner..	1955:	Von der Paarung der Honigbiene Z.f.B..Bd.3. H.1.
Böttcher,F.K.u. A.Mertens..	1937:	Neue Versuche zur Erzielung selektionierter Paarungen von Bienenköniginnen u. Drohnen im Flugkäfig. Dtsch.Imkerführer II.Jahrg.
Goetze,G..	1925:	Einige Beobachtungen über die Brunst der Bienenkönigin.
Laidlaw,Harry,H.jr..	1944:	Artifical insemination of the queen bee (Apis mellifica L.)
Livenetz,T.P..	1951:	Verfliegen der Drohnen. Ptschelowodstwo H.1
Mackensen,O.and Roberts,W.C..	1948:	A manual for the artifical insemination of queen bees. U.S.Dep. of Agri./Agri. Res. Admin./Bureau of Ent. and Pl.Quar.

RUDOLF BAEHR DRUCK- UND WERBETECHNIK
WÜRZBURG